(Aus der dermatologischen Klinik in Basel.
[Direktor: Prof. *Bloch.*])

Über den Nachweis des pigmentbildenden Oxydationsfermentes im Hautbrei und in Hautextrakten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Eugène Ducrey
Med. pract. aus Sitten (Wallis)

Sitten 1917
Buchdruckerei Peter Pfefferlé

(Aus der dermatologischen Klinik in Basel.
[Direktor: Prof. *Bloch.*])

Über den Nachweis des pigmentbildenden Oxydationsfermentes im Hautbrei und in Hautextrakten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Eugène Ducrey

Med. pract. aus Sitten (Wallis)

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Sitten 1917

Buchdruckerei Peter Pfefferlé

Von der medizinischen
Fakultät Basel
genehmigt auf Antrag
von
Professor Dr. Br. Bloch

Die exakte Formulierung der Pigmentgenese durch Bloch als ein Oxydationsprozess, bedingt durch eine neu entdeckte in der Basalschicht der Epidermis lokalisierte spezifische Oxydase (Dopaoxydase) hat einem langdauernden Streit über den Charakter dieser Vorgänge ein Ende bereitet; denn an Stelle hypothetischer Vorstellungen sind nun klare chemische Begriffe getreten. Durch Blochs Untersuchungen steht es fest, dass der Werdeprozess des Pigmentes nicht nur eine Oxydation und Kondensation eines Chromogens ist, sondern dass dieser Vorgang einen ungemein spezifischen Charakter trägt, welcher für die Beurteilung des Chromogens eine wertvolle Handhabe bietet. Das oxydierende Ferment, die Dopaoxydase, hat mit den bisher bekannten, den Phenolasen und der Tyrosinase nichts gemein, da es sich weder durch die Indophenolblausynthese noch durch Tyrosin nachweisen lässt. Ein einziger Körper, das Dioxyphenylalanin (Dopa) konnte bisher gefunden werden, welcher durch Vermittlung dieses Fermentes unter Bildung eines schwarzen Melanins oxydiert wird. Alle Versuche Blochs, durch Veränderungen des Moleküls, sei es am Ring oder an den Seitenketten, weitere oxydable Substanzen zu finden, um so dem biologischen Reaktionskörper, auf welchen die Oxydase eingestellt ist, näher zu treten, sind bisher gescheitert.

Da der Oxydationsprozess nicht nur in Bezug auf Lokalisation, sondern auch auf Intensität des Ausschlages mit der normalen Pigmentbildung Hand in Hand geht (siehe die Arbeit von Bloch und Ryhiner), so ist darum der Schluss, den Bloch zieht, dass nämlich das Dioxyphenylalanin als Muttersubstanz des Pigments oder zum mindesten als ein ihr chemisch sehr nahestehender Körper anzusprechen sei, sehr wahrscheinlich.

Durch die Klarlegung dieser Oxydationsvorgänge ist ein grosser Teil der Hypothesen, welche in Bezug auf den Pigmenstoffwechsel in der Haut aufgestellt worden sind, endgültig aus der Welt ge-

schaffen worden. Ich unterlasse es, auf diesen Teil der Frage näher einzutreten und beschränke mich auf einige Daten, welche auf die vorliegende Arbeit Bezug haben. Im übrigen verweise ich auf die ausführlichen Arbeiten Blochs.

Während in den Anfängen der Pigmentforschung das scheinbar Naheliegenste: Beziehungen zwischen Blutfarbstoff und Pigment, vergeblich gesucht wurde, brachte die Entdeckung enzymartiger Substanzen bei Pflanzen und niederen Tieren, welche die Oxydation farbloser Stoffe zu farbigen Produkten auslöste, neues Licht in das Pigmentproblem. Nach den Feststellungen von Bertrand sind bis jetzt zweierlei pflanzliche Oxydasen zu unterscheiden: die Phenolase (auch Polyphenoloxydase genannt), welche alle möglichen Phenole mit zwei oder mehr OH-Gruppen am Ring und die ihnen entsprechenden Amine zu oxydieren vermag, und die viel spezifischere Tyrosinase, welche ausser Tyrosin und seinen peptidartigen Verbindungen nur Paracresol angreift. Beide Oxydasen wurden auch in den tierischen Geweben nachgewiesen, die Phenolase in den Granulis der myelogenen Leukocyten, manchen Drüsenzellen und den Zellen des Zentralnervensystems. Die Tyrosinase wurde zunächst bei niederen Tieren gefunden, so von Biedermann im Darm des Mehlwurms, von Fürth und Schneider in der Hæmolymphe von Schmetterlingspuppen, von Przibram, Weindl und Gessard in Extrakten des Tintenbeutels von Sepia officinalis.

Es lag auf der Hand, auch nach Beziehungen zu der Melaninbildung in den Organen höherer Tiere zu suchen. So hat Fürth künstlich durch Einwirkung tyrosinasehaltiger Extrakte auf Tyrosin hergestelltes Melanin mit dem natürlichen Pigment, vor allem Hippomelanin, verglichen und dabei den Schluss gezogen, dass die Bildung des natürlichen Melanins bei höheren Tieren aus einem cyclischen Komplex des Eiweissmoleküls (nicht ausschliesslich aus Tyrosin) durch eine Tyrosinase eine gewisse Wahrscheinlichkeit für sich hat. Fürth ist dabei auf den Nachweis einer Tyrosinase in menschlichen Organen gar nicht eingetreten.

Während sich von Fürth eines definitiven Urteils enthält, spricht sich Gessard, gestützt auf seine Studien an Extrakten des Tintenbeutels von Sepia officinalis, ohne weiteres für eine Identität dieser Vorgänge mit der Bildung pathologischen und normalen

Melanins beim Menschen aus, ohne dass ihm dabei ein beweisendes experimentelles Material zur Verfügung stünde. Unter anderen hat auch Unna das Tyrosin und die Tyrosinase in seine Theorie über den Pigmentstoffwechsel aufgenommen.

Während alle genannten Autoren unter Verzicht auf den direkten Nachweis auf rein deductivem Wege, durch Analogieschlüsse zur Annahme der Tyrosingenese des Haut-Pigmentes gelangt sind, hat einzig Florence Durham versucht, die Anwesenheit einer Tyrosinase in der Haut und ihre Rolle bei der Pigmentbildung zu beweisen. Ihre Resultate sprechen in so eindeutigem Sinne zu Gunsten der Tyrosingenese, dass sie in Hinblick auf die von Bloch gemachten Entdeckungen geradezu stutzig machen müssen. Auf Veranlassung von Herrn Professor Bloch habe ich darum die von Durham angestellten Versuche wiederholt. Ich schicke schon jetzt voraus, dass das Resultat, wie zu erwarten war, vollständig negativ ausgefallen ist. Es hätte sich ja angesichts der klaren beweisenden Experimente Blochs erübrigt, auf die Tyrosinfrage nochmals einzutreten. Das vollständig negative Verhalten von Tyrosin, Adrenalin und anderen aromatischen Substanzen bei der Reaktion im Hautschnitt liessen darüber keine Zweifel zu.

Durham experimentierte mit Hautextrakten von Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen. Sie verwendete zu ihren Versuchen ausschliesslich junge Tiere oder Embryonen, da sie in deren Haut einen stärkeren Gehalt an Oxydase vermutete und durch ihre Experimente auch festgestellt haben will. Zur Gewinnung des Extraktes wurden die Bälge der Tiere in der Wurstmaschine zerkleinert und in einem Achatmörser mit Kieselguhr und destilliertem Wasser verrieben. Durch Auspressen des Gewebebreies wurde ein rötlicher opaker Saft erhalten.

Dieser Saft wurde mit etwas festem Tyrosin (die genaue Menge gibt D. nicht an) und 1 mgr. Ferrosulfat als Aktivator versetzt und zur Vermeidung bakterieller Zersetzungen etwas Toluol zugegeben. In gleicher Weise wurde auch durch Kochen desaktivierter Pressaft behandelt. Eine Reihe von Röhrchen, welche nur mit den einzelnen Reaktionskomponenten versetzt waren, dienten als Kontrolle. Die Versuchsreihen wurden im Brutschrank und bei Zimmertemperatur gehalten.

D. gibt kein genaues Protokoll ihrer Beobachtungen und beschränkt sich auf eine summarische Mitteilung: Nach 24 Stunden zeigte der bei 37° gehaltene Saft, welcher Tyrosin, Ferrosulfat und Toluol enthielt, eine Dunkelung, und eine schwarze Substanz schlug sich am Boden des Röhrchens nieder. Im weiteren Verlauf der Beobachtung nahm diese Erscheinung noch zu. Im Gegensatz dazu blieben sämtliche übrigen Röhrchen vollständig unverändert. Liess D. den Pressaft eine Zeit lang stehen oder behandelte sie die Haut zuerst mit Alkohol von 95 %, so trat die Reaktion erst nach einer längeren Latentzeit ein, welche bis 10 Tage betrug. D. behandelte schliesslich den Pressaft mit einer gesättigten Lösung von Ammonsulfat, der Eiweissniederschlag wurde mit Ammonsulfat gewaschen, in destilliertem Wasser gelöst, wieder gefällt und nochmals in Lösung gebracht. Die Lösung wurde nach der Entfernung eines unbedeutenden Niederschlages durch Diffusion gegen destilliertes Wasser vom Ammonsulfat befreit und hierauf in der angegebenen Weise mit Tyrosin und Ferrosulfat versetzt. Nach ungefähr 10-tägiger Latenlzeit trat bei 37 Grad der Niederschlag auf. Daraus konnte auf die Eiweissnatur des Fermentes geschlossen werden. Material von weissen und albinotischen Tieren verhielt sich negativ. Bei Verwendung gelber Haut fiel ein orangefarbener Niederschlag aus.

Die Angaben lassen an Deutlichkeit nichts zu wünschen übrig und Durham steht nicht an, die vollen Konsequenzen aus ihren Versuchsergebnissen zu ziehen. Demnach existiert in der Haut eine Substanz, welche bei Gegenwart eines Aktivators Tyrosin zu einem melaninartigen Produkt oxydiert. Der schwarze Niederschlag kann kaum anders als in diesem Sinne gedeutet werden. Die Substanz ist ein wasserlöslicher eiweissartiger Körper und lässt sich daher leicht extrahieren. Sie wird durch Kochen zerstört und hat somit Fermentcharakter. Es handelt sich zweifellos um eine Oxydase, um eine Tyrosinase. Das wesentlichste ist nun aber der Umstand, dass nur pigmentierte Haut die Reaktion gibt, farblose und albinotische Haut dagegen nicht. Dadurch wäre der Zusammenhang zwischen Pigment und Tyrosinase gegeben. Er erfährt noch eine weitere fast sensationelle Beleuchtung dadurch, dass farbige Haut bei der Reaktion einen farbigen Niederschlag gibt. Das liesse die

Gegenwart eines neuen Fermentes vermuten und würde für die Richtigkeit der Hypothese von Cuénod sprechen, auf welche sich Durham beruft, wonach die Pigmentbildung bei farbiger Haut durch die Gegenwart mehrerer Fermente und eines Chromogens bedingt sei; denn als Chromogen kommt ja allein Tyrosin in Betracht.

Im schroffsten Gegensatz dazu steht die Beobachtung Blochs, dass Tyrosin bei seiner Einwirkung auf den Hautschnitt auch nach längerer Beobachtungszeit nicht den geringsten Reaktionsausschlag hervorbringt, sich also einem eventuell vorhandenen Ferment gegenüber vollkommen passiv verhält. Die Versuchsanordnung Blochs hat vor derjenigen Durhams den grossen Vorteil voraus, dass sie einen grösseren Eingriff vermeidet, die Wirkung der Oxydase auf den Indikator somit in loco und unter der Kontrolle des Mikroskops beobachtet werden kann.

Ich habe die Versuche von Durham zunächst genau nach den Angaben der Autorin angestellt. Es wurde hiezu die Haut von jungen oder fötalen Meerschweinchen verwendet, in einigen Fällen auch andere Gewebe, wie Leber, Fettgewebe, Herzmuskel in den Versuch mit einbezogen. Ich gebe im folgenden einen kurzen Auszug der Protokolle.

1. Versuch. Zwei ca. siebenwochen alte Meerschweinchenföten wurden rasiert und enthäutet. Die tiefschwarzen Bälge wurden fein zerkleinert, mit Kieselguhr und 15 ccm aq. dest. im Mörser fein verrieben und ausgepresst. Der erhaltene graue, stark getrübte Saft wurde zur Klärung zentrifugiert; dabei setzte sich am Boden des Glases ein tiefschwarzes Sediment von Melanin ab. Nach Verdünnung mit 20 ccm phys. NaCl-Lösung resultierte eine hellgraue stark opaleszierende Flüssigkeit. Ein Teil des Saftes wurde durch 15 Minuten langes Kochen im Wasserbad desaktiviert. In ähnlicher Weise wurden subcutanes Fettgewebe, Leberparenchym und Herzmuskel behandelt. Die Versuchsanordnung war folgende:

1.	Röhrchen	4 ccm	Saft	+	Tyrosin einige Körner	+	Ferrosulfat (0,1 ccm 1 % Lg)	+	Toluol einig. Trpf.
2.	„	4 „	„	+	„	ohne	„	+	Toluol
3.	„	4 „	„	ohne	„	+	„	+	„
4.	„	4 „	„	ohne	„	ohne	„	+	„
5.	„	4 „	gekocht. S.	+	Tyrosin	+	Ferrosulfat	+	„
6.	„	4 „	aq. dest.	+	„	+	„	+	„

Es wurde je eine Serie im Brutschrank und bei Zimmertemperatur aufgestellt. Das Ergebnis der sich über 10 Tage erstreckenden Beobachtung war folgendes:

(vide beiliegende Tabelle I.)

2. Versuch. Drei siebenwochen alte Meerschweinchen mit schwarzer, gelber und weisser Haut wurden nach Entfernung der Haare enthäutet. Das Unterhautzellgewebe wurde von der Haut möglichst vollständig abpräpariert und diese nach Zerkleinerung mit dem Messer mit Kieselguhr und Kohlensäureschnee im Achatmörser im gefrorenen Zustand solange verrieben, bis eine feine Emulsion daraus resultierte. Die Masse wurde hierauf mit 25 ccm aq. dest. versetzt und in der hydraulischen Presse bei 50 Atm. Druck ausgepresst. Auf diese Weise erhielt man ca 30 ccm einer leicht opalescierenden Flüssigkeit. In genau derselben Weise wurden 14 gr. Leberparenchym der getöteten Tiere präpariert und daraus ungefähr gleichgrosse Mengen eines braunrötlichen Saftes gewonnen. Die Hälfte der erhaltenen Flüssigkeiten wurde zur Desaktivierung 15 Minuten lang im Wasserbad gekocht und der dabei entstehende Eiweissniederschlag abfiltriert. Die Versuchsanordnung war dem Vorgang Durhams entsprechend folgende:

1.	Röhrchen	1	ccm	Saft	+	Tyrosin einige Körner	+	Ferrosulfat (0,1 ccm 1 % Lg.)	+	Toluol einig. Trpf.
2.	„	1	„	„	+	„	ohne	„	+	„
3.	„	1	„	„	ohne	„	+	„	+	„
4.	„	1	„	„	ohne	„	ohne	„	+	„

In sämtlichen Röhrchen wurde noch 5 ccm physiologische Kochsalzlösung zugesetzt.

5.	Röhrchen	1	ccm	Saft	+	5 ccm 2 ‰ alkal. Tyrosinlösung
6.	„	1	„	„	+	5 ccm 1 ‰ Adrenalinlösung
7.	„	1	„	„	+	5 ccm 1 ‰ Dopalösung.

Eine zweite Serie von Röhrchen wurde in ganz derselben Weise mit dem gekochten Pressaft angesetzt. Die Mischungen wurden im Brutschrank gehalten und nach 12 und 36 Stunden beobachtet. Es ergab sich dabei folgendes:

(vide beiliegende Tabelle II.)

Der nach Angabe der Durham mit Tyrosin und Ferrosulfat versetzte Hautpressaft zeigte auch nach tagelanger Einwirkungsdauer im Brutschrank nicht die geringsten Veränderungen, welche auf die Bildung eines Melanins schliessen liessen; von schwarzen Pigmentniederschlägen, wie sie Durham beschreibt, ist keine Rede. Ob schwarze, gelbe oder pigmentlose Haut zum Versuche verwendet wurde, ob der Pressaft gekocht oder ungekocht zur Behandlung gelangte, bleib sich vollkommen gleich. Dasselbe negative Ergebnis haben die mit den Pressäften anderer Gewebe (Fett, Leber, Herz) angestellten Versuche ergeben. Eine Andeutung einer Oxydation des Tyrosins zeigte sich nur im zweiten Versuch in den mit Leberpresssaft angesetzten Röhrchen (brauner Niederschlag mit schwarzen Pünktchen). Doch steht diese Beobachtung vollständig isoliert da.

Im ersten Versuch war der gewonnene Pressaft infolge der viel gröberen Art der Darstellung keine klare Flüssigkeit, sondern stellte vielmehr eine Art verdünnter Emulsion dar; dies äusserte sich auch in der Folge darin, dass durch Ausflockung auf dem Boden der Röhrchen ein mehr oder weniger dichter Satz sich ablagerte. Allein auch in diesem Falle trat weder im Bodensatz noch in der darüber ruhenden meist klaren Flüssigkeit eine spezifische Farbveränderung ein. Die einzige Erscheinung war eine in allen Tyrosin enthaltenden Röhrchen eintretende nur spurweise angedeutete Dunkelung des Bodensatzes. Die Oxydierbarkeit des Tyrosins ist eine sehr geringe und unterscheidet sich darin ganz wesentlich von dem Adrenalin und besonders dem Dioxyphenylalanin. Dies tritt deutlich in den mit diesen Körpern versetzten Pressäften in Versuch 2 hervor, in welchem fast durchwegs eine mehr oder weniger starke Dunkelung und an der Oberfläche Pigmenthäutchen beobachtet wurden. Ein deutlicher Unterschied im Verhalten der einzelnen Häute lässt sich weder beim Adrenalin noch beim Dioxyphenylalanin feststellen, wenn schon bei letzterem eine gewisse Spezifität im Verhalten zu bestehen scheint (nach 36 Stunden ist der Pressaft der schwarzen Haut deutlich dunkler als derjenige der weissen und gelben). Der Umstand aber, dass die gekochten Säfte ebenfalls und zwar in stärkstem Grade gewirkt haben, stellt den Wert dieser Beobachtungen wieder in Frage. Ich werde bei der Besprechung weiterer Versuche darauf zurückkommen.

Aus den Versuchen ergibt sich somit die Tatsache, dass die Bildung eines Melanins aus Tyrosin im Hautpressaft bei den von Durham angegebenen Versuchsbedingungen nicht statt hat. Ebensowenig gibt sich irgend ein Unterschied im reaktiven Verhalten der einzelnen Hautqualitäten in Bezug auf ihre Farbe zu erkennen. Eine grosse Zahl von Kontrollversuchen mit Tyrosin, welche wir auch fernerhin angestellt haben, hat diese Tatsache durchaus bestätigt.

Eine Erklärung für die zu dieser Festellung in schroffem Gegensatze stehenden Angaben Durhams zu finden, fällt schwer, und Zweifel an der Integrität ihrer Versuche drängen sich auf, sei es im Sinne einer fehlerhaften Technik oder einer suggestiven Beein-

flussung in der Beobachtung und Deutung der Resultate. Ich verzichte darauf, dieser Frage näher zu treten.

Nachdem die Rolle des Tyrosins durch unsere Versuche in durchaus eindeutiger Weise klar gestellt worden war, suchten wir zunächst auf demselben Wege nachzuweisen, ob die Dopaoxydase, deren Vorhandensein in der Epidermis nach Blochs Versuchen fest steht, in den Hautpresssaft übergeführt und in ihm nachgewiesen werden könne. In Versuch 1 hatten wir vergleichsweise einen Teil der Röhrchen mit Dioxyphenylalanin angesetzt. Sowohl bei Zimmertemperatur als besonders im Brutschrank trat eine Dunkelfärbung ein, welche sich aber in sämtlichen Röhrchen zeigte, ohne Unterschied darin, ob weisse oder dunkle Haut zum Versuch benützt worden war. Am stärksten fiel die Reaktion bei Verwendung gekochten Presssaftes aus. Dass eine spontane Oxydation des Dopareagens ohne irgendwelche Vorbedingung besonders im Brutschrank statt hat, bewiesen die mehrfach angesetzten Kontrollen. Ich gebe als Beispiel das Protokoll einer Beobachtung.

bei 37 Grad:

1 ‰ Dopa- + Ringerlösung aa. klare farblose Lösung. Aufstellung im Reagensglas.	nach 24 Stunden	Flüssigkeit leicht grau gefärbt, am Boden feines schwarzes Sediment.
	nach 48 Stunden	Flüssigkeit hellgraubraunklar, am Bodem ziemlich reiches Sediment von tuscheschwarzen Körnchen. Auf der Oberfläche dunkelbraunes Häutchen.
	nach 72 Stunden	Keine wesentliche Veränderung mehr.

bei Zimmertemperatur:

idem Aufstellung in flachem Blockschälchen.	nach 12 Stunden	Deutlich hellgraubraune Färbung an der Oberfläche, zartes dunkles Häutchen.
	nach 36 Stunden	Flüssigkeit klar, bräunlich, feines braunes Sediment.

Ist schon durch die spontane Oxydation des Dopas eine ganz erhebliche Fehlerquelle bedingt, welche die Beobachtung und Beurteilung nicht unwesentlich erschwert, so macht der Umstand, dass gekochter Presssaft, in welchem die labile Oxydase nicht mehr enthalten ist (Bloch und Ryhiner), die stärkste Oxydationskraft besitzt, diese Methode zum Nachweis der Oxydase vollständig

illusorisch. Zweifellos sind in dem Pressaft durch den Prozess des Kochens Substanzen entstanden, welche ihrerseits oxydierend wirken. Die Schwärzung des leicht oxydablen Dioxyphenylalanins gibt darum bloss die Gegenwart dieser Körper an.

Der Versuch 2 lässt drei Deutungen zu :

1. Die Oxydase wurde beim Extraktionsprozess zerstört.
2. Die Oxydationskraft der extrahierten Oxydase ist so gering, dass ein deutlicher Ausschlag durch die spontane Oxydation des Dopas verschleiert wird.
3. Die Oxydase ging nicht in den Pressaft über.

In der Annahme, dass letzteres der Fall sei, suchten wir durch Modifikation der Extraktionstechnik das Ziel zu erreichen. Um die Extraktion des Fermentes möglichst zu begünstigen, legten wir besonderes Gewicht auf eine vollständige Zertrümmerung der Haut bis zur Aufschliessung der Zellen. Die Haut wurde darum mit dem Gefriermikrotom in feine Schnitte zerlegt und diese möglichst sorgfältig mit Ringerlösung, in anderen Fällen mit destilliertem Wasser oder Dopalösung und meist unter Hinzufügung von Kohlensäureschnee im Mörser verrieben. Die meist sehr feine Emulsion wurde in der Schüttelmaschine geschüttelt und der Saft durch längeres Zentrifugieren gewonnen. In einzelnen Fällen verzichteten wir auf das Durchschütteln.

Ich gebe die Protokolle zweier Versuche in extenso und beschränke mich im übrigen auf kursorische Angaben, welche ich tabellarisch zur Darstellung bringe. (vide Tabelle V).

3. Versuch. Ein 1 $^1/_2$ jähriges Meerschweinchen mit weiss und schwarz gefleckter Haut wird getötet und nach sorgfältiger Entfernung der Haare enthäutet. Die Prüfung der Dopareaktion ergibt im mikroskopischen Schnitt eine deutliche Schwärzung der Basalzellschicht im pigmentierten Teil, während sich bei der weissen Haut keine Veränderungen zeigen. Weisse und schwarze Hautschnitte werden mit dem Gefriermikrotom in mikroskopisch feine Schnitte zerlegt. Je 8 Gramm davon werden mit 25 ccm 2 $^0/_{00}$ Dopalösung und Kolensäureschnee 1 $^1/_2$ Stunde lang verrieben und gründlich zentrifugiert. In beiden Fällen erhält man ca. 12 ccm klaren Hautsaft, welcher mit der Pipette abgehoben wird. Die Hälfte der gewonnenen Extrakte wird durch ein viertelstündiges Kochen im Wasserbad desaktiviert. Je 2 ccm Hautsaft werden mit 1 ccm 2 $^0/_{00}$ Dopalösung versetzt; in einzelnen Röhrchen wird zur Verhütung allfälliger bakterieller Zersetzung tropfenweise Toluol zugesetzt und

das Ganze bei Zimmertemperatur in Reagensgläschen aufgestellt. Während einer 72 stündigen Beobachtungszeit ergibt sich folgendes:

(siehe beiliegende Tabelle III.)

4. Versuch. 9 Monate altes Meerschweinchen mit gelben Haaren und gelber Haut. Dopareaktion im Schnitt positiv. Die Haut wird mit dem Gefriermikrotom in Schnitte zerlegt und diese mit Kieselguhr und 12 ccm Ringerlösung im Mörser verrieben. Hierauf wird 3 ccm Chloroform zugesetzt und nochmals verrieben, nun eine Stunde lang in der Schüttelmaschine geschüttelt und endlich zentrifugiert. Der erhaltene klare Saft wird zum Teil 15 Minuten lang im Wasserbad gekocht. Je 2 ccm Extrakt werden mit 1 ccm 2 ‰ Dopalösung und als Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und das Ganze bei 37 Grad gehalten. Die Beobachtung ergibt folgendes:

(siehe beiliegende Tabelle IV.)

Durch Zusammenstellung der Resultate erhält man folgendes Bild:

Stärkerer Ausfall der Reaktion.

	Zahl der Versuche	schwarz	weiss	Untersch. nicht vorhanden od. wechsld.	gek.	ungek.	Kein Unterschied
Meerschweinchen	6	3	2	1	4	1	—
Kaninchen	2	—	—	2			—

Was ganz allgemein den Reaktionsverlauf anbetrifft, so bestand derselbe in einem langsam über Stunden und Tage sich erstreckenden Dunklerwerden des klaren, gelblich gefärbten Hautsaftes mit allen Uebergängen vom bräunlichen zum dunkelbraunen, grauschwarzen bis tiefschwarzen Ton. Bei stärkerem Ausfall sammelte sich am Boden ein Sediment von dunkeln, meist tuschefarbigen Körnchen an. Die Dunkelung trat in den oberen, der Oberfläche benachbarten sauerstoffreichen Schichten zuerst auf und griff allmählig in die Tiefe. Die beschriebene Erscheinung ist bedingt durch die Oxydation des Dioxyphenylalanins unter Bildung eines schwarzen melaninartigen Körpers und entspricht durchaus dem Bilde, welches in langsamerem Tempo schon in irgend einer Lösung dieses Körpers durch spontane Oxydation zustande kommt. Ich verweise auf das oben mitgeteilte Protokoll über eine derartige Beobachtung. Aus diesem Grunde trat in sämtlichen Röhrchen eine mehr oder weniger starke Dunkelung auf, und die Beurteilung des Reaktionsausfalls konnte sich einzig nach der Intensität dieses Prozesses richten.

Aus sämtlichen Versuchen tritt zunächst eine Erscheinung deutlich hervor, welche schon in Versuch 2 aufgefallen war: das ist

der starke Ausfall der Reaktion in den gekochten Hautsäften; ein Unterschied zwischen weisser und schwarzer Haut war dabei meist nicht festzustellen. Ich habe diese Tatsache bereits erwähnt und dort schon die Vermutung ausgesprochen, dass es beim Kochen entstehende Substanzen sind, welche entweder als Katalysatoren wirken oder als leicht reduzierbare Stoffe direkt die Oxydation unterhalten.

Der nicht gekochte Meerschweinchenhautsaft ergibt unter 6 Fällen dreimal ein mehr oder weniger deutliches Ueberwiegen der Reaktion beim schwarzen Hautsaft über diejenige beim weissen, in zwei Fällen ist es gerade umgekehrt, im letzten endlich ist je nach dem Zeitpunkt der Beobachtung der positive Ausschlag bald auf der einen, bald auf der anderen Seite. Die mit Kaninchenhaut ausgeführten Versuche liessen überhaupt ein differentes Verhalten nach der Qualität der Haut nicht erkennen. Ich betone dabei nochmals, dass die Beurteilung stets eine mehr schätzungsweise war, da eine Dunkelung sozusagen in allen mit Dopa versetzten Extrakten einzutreten pflegte und überdies der Verlauf der Reaktion nie ein momentaner, sondern stets ein äusserst langsamer war.

Die Herstellungsweise des Hautsaftes kann jedenfalls für die Qualität der Reaktion nicht oder nicht allein verantwortlich gemacht werden, da diesselbe nur innerhalb relativ engen Grenzen variierte. Man vergleiche z. B. die Fälle 6 und 9: Der Unterschied in der Technik der Darstellung ist nicht sehr erheblich und doch ist das Resultat ein entgegengesetztes. Dass in Fall 5 nach Behandlung mit Schwefelwasserstoff ein deutlicher Unterschied im Verhalten der schwarzen und weissen Haut auftritt, macht die Beurteilung nicht leichter, da nach Versuchen Blochs die Oxydase durch H_2S zerstört wird

Ein scheinbar spezifiches Resultat ergibt allein Versuch 6. Der Saft der schwarzen Haut zeigt eine deutliche Dunkelung mit geringem Bodensatz, während der Saft der weissen Haut sich in derselben Zeit kaum verändert. Auffallenderweise tritt jedoch die Dunkelung erst nach 96 Stunden auf und ist nicht sehr bedeutend. Die zu wiederholten Malen zur Kontrolle bei Zimmertemperatur aufgestellte Dopalösung ergab in derselben Zeit stets eine helle bis

dunkelbraune Verfärbung und wiederholt auch einen feinen Niederschlag. Um eine besondere Beschleunigung des banalen nicht spezifischen Oxydationsprozesses kann es sich somit in Fall 6 bei der braunen Haut nicht handeln. Umso auffallender erscheint im Gegensatz dazu das negative Verhalten des weissen Saftes, und die Vermutung liegt auf der Hand, dass in diesem Falle die Oxydation hemmende Stoffe eine Rolle gespielt haben.

Aus den Versuchen lässt sich der Schluss ziehen, dass selbst bei sorgfältiger mechanischer Zerkleinerung des Hautgewebes die Dopaoxidase in die Extraktionsflüssigkeit (dest. Wasser, Ringerlösung) nicht übergeht, oder wenigstens in ihr nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden kann. Die häufig beobachtete Dunkelung beruht auf einer banalen Oxydation des Dioxyphenylalanins, vermutlich unter dem Einfluss oder durch Vermittlung von in den Hautsäften enthaltenen oder beim Stehen in ihnen sich bildenden nicht spezifischen Substanzen

Eine bedeutend grössere Aussicht auf Erfolg musste der Versuch haben, im Epidermisbrei durch Dioxyphenylalanin die Oxydase nachzuweisen. Die bei Behandlung mit Dopalösung im mikroskopischen Schnitte von Bloch nachgewiesene in den Basalzellen der Epidermis stattfindende Melaninbildung musste sich aller Erwartung nach auch in einer aus solchen Schnitten bezw. Schnittfragmenten bestehenden Emulsion makroskopisch durch eine Farbenveränderung kund geben. Nach den Erfahrungen mit den Hautsäften war allerdings mit einer Verschleierung des Reaktionsbildes durch Spontanoxydation des Dopas zu rechnen, doch war dadurch eine erhebliche Störung der Beobachtung weniger zu erwarten, da eine kräftige Reaktion am spezifischen Ort einen hinreichenden Kontrast zu verbürgen schien.

In dieser Versuchsreihe wurde nicht nur wie bisher Tierhaut, sondern auch Integument vom Menschen verwendet. Um unter möglichst gleichbleibenden Bedingungen zu arbeiten (was bei Verwendung der Häute verschiedener Individuen im gleichen Versuch nicht der Fall gewesen wäre), möglichst grosse Differenzen zu erhalten und die gewonnene Differenz im Ausfall der Reaktion mit Sicherheit auf Unterschiede der Pigmentbildung, d. h. An- oder Ab-

wesenheit des pigmentbildenden Fermentes (Dopaoxydase) beziehen zu können, wurde, wie schon beim Tier, zu einem Versuch jeweilen die pigmentierte und nicht pigmentierte Haut eines und desselben gescheckten, d. h. in diesem Falle viliginösen (da angeborenes Gescheckt sein beim Menschen nicht vorkommt) ausgewählt.

Ich beschränke mich wie oben auf die ausführliche Darstellung bloss einzelner Versuche, während ich die übrigen in einer Tabelle übersichtlich zusammenfasse. (Vide Tabelle X.)

12. Versuch. Excision bei Frl. F. mit Vitiligo. Es werden normale und depigmentierte Hautstücke gewonnen. Die Haut wird nach Bloch und Ryhiner in Agar eingebettet, mit dem Gefriermikrotom zerkleinert und im Achatmörser mit Kohlensäureschnee und 1 ccm dest. Wasser verrieben. Die eine Hälfte der Emulsion wird in einem flachen Schälchen mit 1 ccm destilliertem Wasser und 1 ccm einer 1 $^0/_{00}$ Dopalösung versetzt. Die andere Hälfte wird in gleicher Weise mit der entsprechenden Menge 1 $^0/_{00}$ schwach alkalischer Tyrosinlösung behandelt. Die Mischungen werden 16 Stunden lang bei 37^0 gehalten, nachher auf Zimmertemperatur gestellt. Es ergibt sich dabei folgendes:

(vide beiliegende Tabelle VI.)

13. Versuch. Herr X mit Vitiligo; Es werden aus pigmentierten und pathologisch depigmentierten Hautflächen 2 gleich grosse Stücke excidiert. Nach sorgfältiger Abpräparierung des Unterhautzellgewebes werden die Hautstücke in Agar eingebettet und mit dem Gefriermikrotom fein verschnitten. Die in destilliertem Wasser aufgefangenen Schnitte werden im Achatmörser mit Kohlensäureschnee und 2 ccm 1 $^0/_{00}$ Dopalösung verrieben. Die erhaltenen Emulsionen werden zur Hälfte mit Dopalösung versetzt und dann in flachen Schälchen zur Hälfte im Brutschrank, zur Hälfte in Zimmertemperatur aufgestellt. (Siehe Tabelle VII.)

15. Versuch. 1 $^1/_2$ Jahre altes Meerschweinchen, weiss und schwarz gefleckt. Die schwarze Haut gibt im Schnitt eine positive Dopareaktion. Je 8 Gramm schwarze und weisse Haut werden mit dem Gefriermikrotom verschnitten, hierauf mit 25 ccm 2 $^0/_{00}$ Dopalösung und Kohlensäureschnee 1 $^1/_2$ Stunden lang verrieben. Durch Zentrifugieren wird der Hautsaft entfernt, der Rückstand mit 10 ccm 2 $^0/_{00}$ Dopalösung aufgeschwemmt und zur Hälfte im Wasserbad $^1/_4$ Stunde lang gekocht. Im Reagensglase werden je 2 ccm ungekochter und gekochter Emulsion mit und ohne Toluol als Antisepticum bei Zimmertemperatur aufgestellt. Das Ergebnis des Vetsuches siehe auf beiliegender Tabelle VIII.

16. Versuch. 1 $^1/_2$ Jahre altes Meerschweinchen mit weissen, gelben und schwarzen Haaren; die Haut zeigt dieselben Farbenunterschiede. Gleich grosse verschiedenfarbige Hautstücke werden nach Entfernung der Haare in Agar eingebettet und mit dem Gefriermikrotom geschnitten. Die Schnitte werden in destilliertem Wasser aufgefangen und mit Kohlensäureschnee und 1 ccm aq.

dest. verrieben. Die Emulsionen werden in flachen Glasschälchen zum Teil mit 1 ccm 1 ‰ Dopalösung, zum Teil 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt und bei Zimmertemperatur gehalten. Ueber das Ergebnis siehe beiliegende Tabelle IX.

Stellt man ohne Rücksicht auf die Verschiedenheiten in der Herstellungsweise der Hautemulsion zunächst bloss die Versuchsergebnisse zusammen, so ergibt sich folgendes:

	Zahl der Versuche	Stärkerer Ausfall der Reaktion bei				
		schwarz	weiss	kein Unterschied	gekocht	ungek.	kein Unterschied
Mensch (Vitiligo)	3	3	—	—	—	—	—
Meerschweinchen	11	11	Unterschied deutl. 2 „ undeutl. 6 U. nur im Beginn 3		5	1	1
Kaninchen	6	3	2	1	—	—	—

Aus dem Ergebnis dieser Versuche lässt sich ganz allgemein der Schluss ziehen, dass der makroskopische Nachweis der Dopaoxydase durch das Dioxyphenylalanin im Zellbrei gelungen ist; störend wirkt, wie das schon oben hervorgehoben wurde, die spontane Oxydation des Dopas, bezw. das Auftreten von Substanzen in den Emulsionen, welche die Oxydation begünstigen. Stets tritt eine Dunkelung nicht nur der pigmentierten, sondern auch der nicht pigmentierten Haut auf, deren Ursache allein in der spontanen Oxydation des Indikators gelegen ist. Die vielfach angesetzten Kontrollen sprachen alle in diesem Sinne. Die Beurteilung der in den Emulsionen eintretenden Farbveränderungen wird dadurch ganz erheblich erschwert, dass es sich zuweilen um relativ geringfügige Unterschiede handelt, bei deren Einschätzung die subjektive Komponente einen ganz wesentlichen Einfluss hat.

Bei den Versuchen am Menschen mit pigmentierter und pigmentfreier Haut (Vitiligo) stellte sich steets ein deutlicher Unterschied ein.* Nur im ersten Fall machte sich derselbe erst nach 48 Stunden bemerkbar, nachdem die schon stark gedunkelten Schälchen aus dem Brutschrank entfernt und bei Zimmertemperatur aufgestellt worden waren. In diesem Falle hatte bei 37° die vermutlich nicht spezifische Oxydation des Dopa so rasche Fortschritte gemacht, dass ein spezifisches Verhalten nicht mehr ersichtlich war.

* Als solche darf unter Würdigung der oben angegebenen Umstände auch eine Abstufung verwertet werden (z. B. bräunlich schwarz zu vollständig schwarz), welche auf den ersten Blick unwesentlich erscheint.

Die gleiche Erfahrung hat schon Bloch bei der Anstellung seiner Reaktion gemacht, wenn er zu den Versuchen Meerschweinchenhaut benutzte. Im Brutschrank trat jeweilen eine so rasche diffuse Dunkelung des ganzen Schnittes auf, dass dadurch die Deutlichkeit des spezifischen Bildes stark beeinträchtigt wurde.

Die in Versuchen 1 und 3 mit Tyrosin bezw. Tyrosin und Adrenalin vergleichsweise angesetzten Schälchen zeigten im Gegensatz zu Dopa keine oder nur unbedeutende Veränderungen, welche im Sinne einer Melaninbildung nicht gedeutet werden können. So trat in Versuch 14 in der mit Adrenalin versetzten Emulsion der pigmentierten Haut eine blasse Rotfärbung auf, welche die Emulsion der nicht pigmentierten Haut vermissen liess.

Viel weniger klar ist das Ergebnis der Versuche mit tierischer Haut. Beim Meerschweinchen überwog in allen Fällen die Dunkelfärbung der Emulsion der pigmentierten Haut; allein nur zweimal war der Unterschied ein stärkerer, dreimal war er bloss vorübergehender Natur und in den übrigen Fällen nur so gering, dass in Hinblick auf die vielen Fehlerquellen eine Verwertung der Resultate nicht möglich gewesen wäre. Dass es sich dabei nicht etwa um Hautstücke handelte, in denen die Oxydase gar nicht oder nur in verminderter Menge vorhanden war, dafür spricht die unter dem Mikroskop beobachtete positive Dopareaktion im Schnitt der pigmentierten Haut, welche mehrmals angestellt wurde, so u. a. in den Fällen 7, 8, 9, bei welchen die Differenz im Reaktionsausschlag zwischen weisser und schwarzer Haut eine nicht sehr erhebliche war.

Die Emulsionen wurden teilweise in Reagensgläschen, teilweise zur Begünstigung der Oxydation in flachen Blockschälchen aufgestellt. Ein Einfluss in Bezug auf die Qualität der Reaktion liess sich dabei nicht erkennen. Den Einfluss der Bruttemperatur habe ich bereits erwähnt. Als Kontrollen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung angesetzte Emulsionen und in einer grossen Zahl von Versuchen auch die Reaktionskörper: Dopa, Adrenalin, Tyrosin ohne jeden Zusatz aufgestellt. Ich habe in der Tabelle über die dabei gemachten Beobachtungen nicht berichtet und kann dies jetzt zusammenfassend nachholen, da die Ergebnisse stets dieselben waren.

Die mit physiologischer Kochsalzlösung angesetzten Hautemul-

sionen blieben auch nach längerem Stehen unverändert. Die Lösung des Dioxyphenylalanins zeigte bei Zimmertemperatur eine zunehmende Bräunung und zuweilen einen feinen grauschwarzen Niederschlag; im Brutschrank bildete sich ziemlich bald ein dunkles Häutchen auf der Oberfläche und ein Niederschlag von feinen tuscheschwarzen Körnchen (siehe auch das mitgeteilte Protokoll). Bei Verwendung flacher Blockschälchen nahmen diese Vorgänge einen rascheren Verlauf als in Reagensgläschen, was sich aus der grösseren Berührungsfläche zwischen Luft und Flüssigkeit leicht erklärt. Stets war die Dunkelung des Dopas geringer als die Farbenveränderung in den Hautemulsionen, so dass in diesen eine Beschleunigung der Oxydation, sei sie spezifischer Natur (Dopaoxydase) oder unspezifisch angenommen werden muss.

In einer Reihe von Versuchen wurde zum Zwecke der Gevinnung des Hautsaftes der Hautbrei nach dem Verreiben zentrifugiert und nur der Rückstand zur Emulsion benützt; in diesen Fällen war der Ausschlag ganz allgemein schwächer als bei jenen Hautemulsionen, bei welchen der Hautsaft nicht entfernt worden war. Das würde für einen Uebergang von Oxydase in den Hautsaft sprechen. Die Prüfung des letzteren auf seine Oxydationskraft mit Dioxyphenilalanin ergab in der Regel eine mehr oder weniger starke Bräunung oder Schwärzung des zugesetzten Reaktionskörpers, ohne Unterschied aber ob pigmentierte, also oxydasehaltige oder pigmentfreie Haut vorlag. Es besitzt demnach, wie wir schon oben gesehen haben, jeder Hautextrakt bei einer längeren Einwirkungsdauer eine gewisse oxydative Kraft, welche jedoch zu der Dopaoxydase in keiner nachweisbaren Beziehung steht. Ob diese in den Zellsaft übergeht, konnten wir in unseren Versuchen nicht entscheiden, jedenfalls nicht ausschliessen.

Wurde die Emulsion vor dem Versuche gekocht (15 Minuten im Wasserbad), so trat, wie das schon bei den Hautextrakten beobachtet worden war, in der Mehrzahl der Fälle eine Dunkelung auf, welche zuweilen einen beträchtlichen Grad erreichte und vom Pigmentgehalt der Haut vollständig unabhängig war.*

Die mit Kaninchenhaut erzielten Ergebnisse sind am

* Auch Bloch hat diese Erscheinung an seinen Schnitten beobachtet und auf die oxydierende Wirkung von Substanzen zurückgeführt, welche durch Abbau der Eiweissstoffe beim Prozess des Kochens entstehen.

schwierigsten zu deuten, da sie sich direkt widersprechen. Der stärkere Ausfall ist in drei Fällen bei schwarz, in zwei Fällen bei weiss, in einem Fall lässt sich ein Unterschied nicht feststellen. Noch unklarer wird die Sachlage beim Vergleich der Fälle 26, 29 und 30, bei welchen zu verschiedenen Zeiten mit entsprechenden Hautstücken desselben Tieres experimentiert wurde. Bei 26 besteht ein grosser Unterschied zwischen dem Reaktionsausschlag der weissen und schwarzen Haut und zwar zu Gunsten der letzteren, dasselbe tritt, wenn schon weniger deutlich, auch in Fall 29 ein; ganz anders aber fällt das Resultat bei Fall 30 aus. Hier zeigt die Emulsion der hellen Haut eine unverkennbar stärkere Dunkelung als die der dunkeln. Dass dabei optisch aktives Dopa benützt wurde, kann nicht dafür verantwortlich gemacht werden, da dieser Körper nach den Versuchen Blochs dieselbe spezifische Wirkung hat, wie racemisches Dopa, ein vollständig differentes Verhalten bei dieser Versuchsanordnung darum nicht zu erwarten ist. Die Herstellungsweise der Emulsionen ist in den Fällen 26 und 30 ungefähr dieselbe: Verreiben der mit dem Gefriermikrotom geschnittenen Haut mit Kohlensäureschnee und etwas destilliertem Wasser zu einer homogenen Emulsion; beim Versuch wird diese mit der halben Menge Dopa angesetzt. Beide Beobachtungen wurden bei Zimmertemperatur gemacht. Als „schwarze“ Haut wurden meist scharf umschriebene, blauschwarze Hautstellen excidiert, welche sich auf dem Rücken der meisten zu solchen Versuchen schon verwendeten Kaninchen vorfanden, und deren Pigmentgehalt nicht eine primäre Erscheinung darstellte, sondern erst sekundär durch eine meherere Wochen vorausgegangene Enthaarung hervorgerufen worden war. Man muss sich diese Erscheinung als eine Reaktion der Haut auf den starken Lichtreiz, welchem die Haut durch die Enthaarung schutzlos preisgegeben wurde, vorstellen, wobei das nicht unerhebliche Trauma beim Ausreissen der Haare ebenfalls eine Rolle spielen dürfte. Die dunkle Haut gab im Fall 26 im mikroskopischen Schnitt eine deutliche Dopareaktion (kompaktes schwarzbraunes Band in der Basalzellschicht der Epidermis, Schwarzfärbung der Bulbi). Die Verwendung dieser Hautstellen, in denen die gesteigerte Pigmentierungstätigkeit auch einen vermehrten Gehalt an Oxydase vermuten liess, schien deshalb gerechtfertigt.

Natürlich deutet der Pigmentgehalt der Haut nur die stattgehabte Pigmentgenese an, ohne sie zeitlich zu definieren. Das bei diesem Vorgang tätige Ferment kann darum bereits an Menge abgenommen haben oder vollständig verschwunden sein, während das gebildete Pigment noch längere Zeit an Ort und Stelle verweilt. Das Pigment ist infolgedessen kein Beweisobjekt für das Vorhandensein der Oxydase. In diesem Sinne liesse sich vielleicht die grosse Verschiedenheit in den Resultaten damit erklären, dass die verwendeten dunkeln Hautstücke bei gleichem Pigmentreichtum sich durch den verschiedenen Gehalt an Oxydase unterschieden und demzufolge auch ein ganz verschiedenes Oxydationsvermögen hatten. Da in den erwähnten Fällen 16 und 30 die mikroskopische Kontrolle der Dopareaktion in den Schnitten fehlt, so lässt sich diese Möglichkeit jedenfalls nicht ausschliessen.

Die mit Tyrosin und Adrenalin angestellten Reaktionen fielen auch beim Tier vollständig negativ aus. Im Fall 21 wurde wieder das Auftreten eines rötlichen Tones bei der mit Adrenalin versetzten pigmentierten Hautemulsion beobachtet, als wahrscheinliches Zeichen dafür, dass eine geringgradige Oxydation des Adrenalins stattgefunden hat. Ich erwähne diese Tatsache der Vollständigkeit halber; eine besondere Bedeutung für die behandelte Frage kommt ihr kaum zu.

In Bezug auf die Herstellungsweise der Emulsion fanden einige Variationen statt, welche auf der Tabelle figurieren. Einen wesentlichen Einfluss auf den Ablauf der Reaktion schienen sie nicht zu haben. Eine Behandlung der Emulsion mit Schwefelwasserstoff im Fall 17 hatte wieder eine stärkere nicht spezifische Dunkelung der Haut zur Folge, wie schon der Versuch mit dem Presssaft ergeben hatte. Auch in diesem Fall muss man eine chemische Veränderung im Hautbrei für die Reaktion verantwortlich machen.

Zusammenfassung.

Die von Florence Durham mitgeteilte Beobachtung, wonach im Presssaft pigmentierter tierischer Haut eine Oxydase, (Tyrosinase) sich befinden soll, welche in spezifischer Weise aus Tyrosin ein Melanin bildet, entspricht den Tatsachen nicht. Jeder Versuch,

sowohl im Extrakt als auch im Zellbrei menschlicher wie tierischer Haut mit Tyrosin eine Reaktion zu erhalten, blieb vollständig erfolglos, auch wenn genau dieselben Versuchsanordnungen getroffen worden, wie sie Durham angibt.

Aehnliche Versuche mit Adrenalin führten zu demselben negativen Resultat.

Die mit Dioxyphenylalanin (Dopa) versetzten Pressäfte und Hautextrakte zeigten zwar eine regelmässige Dunkelung und das Auftreten mehr oder weniger reichlicher melaninartiger Niederschläge, allein die Reaktion verriet keinen spezifischen Charakter und beruht vermutlich auf dem Vorhandensein oder der Entstehung nicht spezifischer oxydierender Substanzen im präparierten Zellsaft, auf welche das leicht oxydable Dopa ein viel feineres Reagens ist, als Tyrosin bezw. Adrenalin. Die beim Kochen des Hautsaftes fast regelmässig beobachtete Verstärkung der Reaktion muss ebenfalls auf diese Weise gedeutet werden.

Ob bei der Extraktion die von Bloch entdeckte Dopaoxydase in den Zellsaft übergeht, liess sich nicht entscheiden, mit Sicherheit jedenfalls nicht ausschliessen.

Die in gleicher Weise wie der Hautsaft mit Dopa versetzten Hautemulsionen lassen im Gegensatz dazu ein spezifisches Verhalten in dem Sinne erkennen, dass die in allen Fällen eintretende auf einer Oxydation des Dopas beruhende Dunkelung in den Emulsionen pigmentierter Haut einen stärkeren Grad erreicht, als in solchen nicht pigmentierter. Daraus darf geschlossen werden, dass zu der sozusagen immer stattfindenden unspezifischen Oxydation des Reaktionskörpers eine spezifische Komponente hinzutritt, welche Beziehungen zum Pigmentgehalt der Haut hat. In Hinblick auf den von Bloch gefundenen Zusammenhang zwischen Dopaoxydase und Pigment ist der Schluss berechtigt, dass es die Dopaoxydase ist, welche den stärkeren Ausfall der Reaktion bedingt.

Während beim Menschen in drei Fällen von Vitiligo der Reaktionsunterschied stets ein deutlicher und beweisender war, machte die Beurteilung beim Tier häufig grössere Schwierigkeiten, welche in der Regel durch die starke unspezifische Oxydationskraft der tierischen Gewebe bedingt war. Doch liess sich in einem Teil dieser Versuche ein deutliches spezifisches Verhalten erkennen.

Die vielen Fehlerquellen, welchen die Methode unterworfen ist, lassen sie zum Nachweis der Dopaoxydase wenig brauchbar erscheinen, zumal die nicht spezifischen Faktoren, welche die Oxydation des Dopas beeinflussen, gar nicht berechenbar sind, so dass ein Schluss auf die Qualität der Reaktion aus ihrer Stärke allein nicht ohne weiteres zulässig ist.

Tabelle I.

Versuch 1	Temperat.	Aussehen bei Beginn	Nach 24 Stunden	Nach 48 Stunden	Nach 10 Tagen
a) Haut					
1. Saft + Tyrosin + Ferrosulfat + Toluol	Z. T.	Weisslich grau opaleszierend	In sämtlichen Röhrchen heller, graugrünlicher, durch Ausflockung entstandener Bodensatz	In sämtlichen Röhrchen hellgrauer Bodensatz, die darüber stehende Flüssigkeit hellgeblich klar	In sämtlichen Röhrchen hellgrauer flockiger Bodensatz in welchem die unveränderten Tyrosinpartikelchen als weissliche Einsprengungen sichtbar sind. Flüssigkeit hellgelb bis farblos, bei 5 leicht bräunlicher Ton
2. Saft gekocht + Ferrosulfat		id. mit grauweissem Bodensatz			
3. Saft + Ferrosulfat + Toluol		Wie 1.			
4. Saft + Toluol		id.			
5. Saft + Tyrosin + Toluol		id.			
Dieselbe Reihe	Brutschrank	id.	Alles wie bei Zimmer-	temperatur	
Controlle					
dest. Wasser + Ferrosulfat + Tyrosin + Toluol	Z. T.	Klare farblose Flüssigkeit, weisser Bodensatz (Tyrosin)	Keine Veränderung	Keine Veränderung	Keine Veränderung
	Brutschrank	id.	Keine Veränderung	Bodensatz zeigt spurweise Dunkelung; hellgrauweiss	Dunkelung hat nur noch ganz wenig zugenommen
b) Herzmuskel					
1. Saft + Tyrosin + Ferrosulfat + Toluol	Z. T.	Hellrötlich trüb opaleszierend	In sämtlichen Röhrchen hellgrau-weisser flockiger Bodensatz; Flüssigkeit hellgelblich, fast klar.	Wie nach 24 Stunden	Keine weitere Veränderung
2. Gekochter Saft + Ferrosulfat		Grauweisser Bodensatz mit schwach bräunlichem Ton			
3. Saft + Ferrosulfat + Toluol		Wie 1.			
4. Saft + Toluol		id.			
5. Saft + Tyrosin + Toluol		id.			
Dieselbe Reihe	Brutschrank		Klare gelbliche Flüssigkeit mit reichlichem weisslich grauem flockigem Bodensatz; in den Röhrchen 1 und 3 hat der Bodensatz einen mehr bräunlichen Ton.	Wie nach 24 Stunden	Keine weitere Veränderung
c) Leberparenchym					
Dieselbe Reihe 1—5 wie bei *a*) und *b*)	Z. T.	Trüb hellrötlich opaleszierend bei 2. flockiger weisslicher Niederschlag	Klare gelbliche Flüssigkeit mit weisslich flockigem Bodensatz; dieser hat in den Röhrchen 1 und 3 einen leicht bräunlichen Farbton.	Wie nach 24 Stunden	Röhrchen 1—4: klare hellgelbliche Flüssigkeit (bei 4 leicht getrübt) mit weisslichem Bodensatz, Röhrchen 5, trübe, gelbliche Flüssigkeit, hellgraubrauner Bodensatz
Dieselbe Reihe	Brutschrank		Alles wie bei Zimmer-	temperatur	
d) Fettgewebe					
Dieselbe Reihe 1—5 wie bei *a*), *b*) und *c*)	Z. T.	Trüb rötlichgelb opaleszierend. Bei 2 hellbraungelber Bodensatz	In allen Röhrchen braungelber flokkiger Bodensatz. Flüssigkeit fast wasserklar mit gelblichem Farbton.	Wie nach 24 Stunden	Keine weitere Veränderung
Dieselbe Reihe	Brutschrank		Alles wie bei Zimmer-	temperatur	

Tabelle II.

Versuch 2	Saft der weissen Haut		Saft der schwarzen Haut		Saft der gelben Haut		Leberpressaft	
	Nach 12 Stunden im Brutschrank	Nach 36 Stunden	Nach 12 Stunden	Nach 36 Stunden	Nach 12 Stunden	Nach 36 Stunden	Nach 12 Stunden	Nach 36 Stunden
a) ungekocht								
1. Pressaft + Toluol + Ferrosulfat	hell etwas opalescent keine Reaktion	wie nach 12 Stunden	= 1) a weisse Haut	unverändert	= 1) a weisse Haut	unverändert	braunrötlich	Flüssigkeit grünlich, Niederschlag braun
2. Pressaft + Ferrosulfat + Toluol	wie 1) a	wie nach 12 Stunden	Spur gelblicher als 2) weisse Haut	unverändert	leicht bräunlicher Niederschlag, Flüssigkeit wasserklar, Spur bräunlich	„	etwas röter als 1) a, klar	Flüssigkeit grünlich, Niederschlag braun schmutzig
3. Pressaft + Tyrosin + Toluol	Flüssigkeit mit einem Stich ins rötliche. Tyrosin füllt die ganze Kuppe des Reagenzglases aus	Flüssigkeit klar, ausgesprochene Rosafärbung, Niederschlag rosa.	= 3) a gelbe Haut	Spur rötlich	Stich ins gelbliche	hell, keine Färbung	Flüssigkeit = 2) a, Leber Tyrosinbraun gefärbt	Flüssigkeit gelblich rötlich, Tyrosin bräunlich
4. Pressaft + Tyros. + Ferrosulfat + Toluol	Flüssigkeit gelb, grünlicher Stich, im übrigen hell	Flüssigkeit klar, eine Spur rosa gefärbt, viel schwächer als 3 a	= 4) a weisse Haut	Spur rötlich	wie bei 4) a, weisse Haut	gleich 3) a, gelbe Haut	= 3) a Leber Tyrosin ebenfalls hellbraun	wie 3) a Leber
5. 1 ccm Pressaft & 5 ccm Tyrosinlösung	wie 1) a.	unverändert	= 5) a weisse Haut	unverändert	wie bei 5) a, weisse Haut	unverändert	Flüssigkeit rot, brauner Niederschlag mit schwarzer Punktur	Flüssigkeit schmutzig braunrot, Niederschlag braun mit schwarzen Punkten
6. 1 ccm Pressaft + 5 ccm Adrenalin	Flüssigkeit kastanienbraun, Stich ins rötliche	dunkelbraun, etwas brauner Niederschlag	= 6) a weisse Haut	etwas dunkler als 6) a, weisse Haut	wie bei 6) a, weisse Haut	etwas dunkler als 6) a, weisse Haut	Flüssigkeit rot, mässiger Niederschlag von braunschwarzer Farbe	Flüssigkeit graugrün, Niederschlag dunkelbraun
7. 1 ccm Pressaft 5 cc. Dopa	Flüssigkeit grau bräunlich	Flüssigkeit trüb, bräunlich an der Oberfläche, tintenschwarzes fetziges Häutchen	dunkler als 7) a weisse Haut, dunkler als 7) a gelbe Haut, Stich in's gelbliche	Flüssigkeit deutlich dunkler (grau braun) als 7) a weisse Haut	rauchgrau mit einem Stich ins grünliche, deutlich dunkler	Flüssigkeit gleich 7) a, weisse Haut. Häutchen weniger dick u. weniger dunkel	Flüssigkeit rosa, Niederschlag braun mit schwarzen Punkten	Flüssigkeit, graugrün, heller als in den anderen entsprechenden Hautextrakten
b) gekocht								
1. Pressaft + Toluol + Ferrosulfat	Flüssigkeit wasserklar hell	unverändert			wie bei 1) b, weisse Haut		Flüssigkeit klar, Stich ins grünliche (Hæmoglobin)	
2. Pressaft + Ferrosulfat + Toluol	schwacher Stich ins grünliche, noch klar	unverändert, leicht flockiger gelber Niederschlag			wie bei 2) b, weisse Haut		= 1) b Leber	
3. Pressaft + Tyrosin + Toluol	im Gegensatz zu 3a) wasserhell, starkes Tyrosin Depot	unverändert	Alles gleich weisse Haut.	unverändert	wie bei 3) b, weisse Haut	unverändert	Tyrosin weiss, Flüssigkeit = 1) b, Leber	unverändert
4. Pressaft + Tyrosin + Ferrosulfat + Toluol	etwas gelblich, ähnlich wie 4) a.	„			wie bei 4) b, weisse Haut		= 3) b, Leber	
5. 1 ccm Pressaft + 5 ccm Tyrosinlösung	klar, Stiche ins gelbliche, ähnlich wie 5) a	„			wie bei 5) b, weisse Haut		= 1) b, Leber	
6. 1 ccm Pressaft + 5 ccm Adrenalin	= 6) a	klar ebenso dunkel wie 6) a		Gleich wie 6) b gelbe Haut	eine Spur dunkler als 6) b, weisse Haut	ebenso dunkel als ungekocht	Flüssigkeit braun	Flüssigkeit klar, mahagonibraun dunkler als in den entsprechenden Hautextrakten
7. 1 ccm Pressaft + 5 ccm Dopa	klar, graubraun, dunkler als 7 a	Ganze Flüssigkeit undurchsichtig, schwarz braun, an der Oberfläche rein schwarze Schicht.		Gleich wie 7) b gelbe Haut	eine Spur dunkler als 7) b, weisse Haut	gleich wie 7) b, weisse Haut	rauchgrau, Flüssigkeit klar	Leicht grau gefärbt mit braunem Bodensatz, viel heller als bei den andern Hautextrakten

Controllflüssigkeiten

	nach 24 Stunden im Brutschrank
5 ccm Tyrosinlösung + 0,1 $FeSO_4$-Lösung	geringer gelblicher Niederschlag (Fe)
0,1 gr Tyrosin solid + 0,1 $FeSO_4$-Lsg. + 5 ccm aq. dest.	unverändert
5 ccm Tyrosinlösung	wasserhell
5 ccm Adrenalinlösung	bräunlich klar
5 ccm Dopalösung	deutlich grau braun

Tabelle III.

Versuch 3. — Saft der schwarzen Haut.

a) *ungekocht*	nach 24 Std.	nach 48 Std.	nach 72 Std.	nach 96 Std.	nach 144 Std.
2 ccm. Saft +					
1) Dopa	Spur bräunlich	Spur bräunlich	bräunlich, dunkler als der Saft der weissen Haut	Ganze Flüssigkeit trüb bräunlich dunkler als der Saft der weissen Haut	ganze Flüssigkeit schwarz
2) Dopa + Toluol	gleich vorhergehend	gleich vorhergehend	heller als a) 1) weniger braun	An der Oberfläche bräunlich dunkel, untere Schicht heller	An der Oberfläche schwarze, breite Schicht, untere Schicht braun
b) *gekocht*					
2 ccm Saft +					
1) Dopa	graubraun dunkler als der ungekochte	graubraun, dunkler als der ungekochte	dunkelbraun	dunkelbraun	dunkelbraun
2) Dopa + Toluol	gleich wie 1) b	gleich wie 1) b	braun bis schwarz	dunkelbraun	schwarz

Versuch 3. — Saft der weissen Haut

a) *ungekocht*	nach 24 Std.	nach 48 Std.	nach 72 Std.	nach 96 Std.	nach 144 Std.
2 ccm Saft +					
1) Dopa	Gleich Saft der schwarzen Haut	entschieden heller als der entsprechende Saft von der farbigen Haut	Oberfläche ein wenig dunkel, Stich ins braungelbliche	Oberfläche bräunlich aber heller als der gefärbte Saft	Obere Hälfte dunkelbraun mit schwarzen Fetzen, untere Hälfte bräunlich viel heller als gefärbte Haut
2) Dopa + Toluol	gleich a) 1	dunkler als d. vorhergehende	dunkler als der entsprechende Saft d. farbigen Haut	das ganze ist dunkelbraun	wie gefärbte Haut
b) *gekocht*					
2 ccm Saft +					
1) Dopa	dunkler als der entsprechende ungekochte Saft	Spur heller als d. entspr. Saft der farbigen Haut	dunkelbraun wie entspr. Saft der farb. Haut	wie gefärbte Haut	wie gefärbte Haut
2) Dopa + Toluol	gleich der vorhergehend.	gleich d. Saft d. farb. Haut	dito	„	„

Tabelle IV.

Versuch 4.

Haut-Saft der gelben Haut

Ungekocht	*Gekocht*
2 cc. Saft + 1 cc. Dopa 2 $^{0}/_{00}$	2 ccm. Saft + 1 ccm. Dopa 2 $^{0}/_{00}$
nach 24 Stunden	
Obere Schicht der Flüssigkeit deutlich dunkel gefärbt grauschwarz, untere hell	Ganze Flüssigkeit dunkel gefärbt dunkelgraubraun, dunkler als die der Schicht beim ungekochten Saft.
nach 48 Stunden	
Braunschwarze Schicht ist breiter geworden, über die Hälfte der Flüssigkeit von dem nach unten	Ganze Flüssigkeit dunker als beim ungekochten Saft
nach 72 Stunden	
Obere Schicht sehr schwarz, untere Hälfte gelblich	Nicht so schwarz wie beim ungekochten Saft

Mit NaCl phys. Lösg. 1 ccm

nach 24 Stunden

opal. ungefärbt

nach 48 Stunden

vollständig hell

nach 72 Stunden

Klare, helle, obere Flüssigkeit, Saft unten geronnen.

Tabelle V.

Versuche mit Hautextrakten.

№	Haut von	Farbe der Hautstücke	Dopareakt. i. Hautschn.	Gewicht d. Hautstücke	Zerkleinerung nach Enthaarung	Zusatz beim Verreiben im Mörser (CO_2 = Kohlensäureschnee)	Gewinnung des Hautsaftes	Aussehen	Versuchsanordnung	Gefäss	Controllen	Temperatur	Ausfall der Reaktion (> Ausfall stärker als; s = schwarze bezw. pigment. Haut; g = gelbe Haut; w = weisse bezw. pigmentarme od. depigment. Haut (Vitiligo))	
3	Meerschw.	Schwarz u. weiss	s. + w. —	8 gr.	Gefriermikrotom	CO_2 + 25 ccm 2 ‰ Dopalsg.	Centrifugieren, Saft teilweise gekocht	klar ?	Saft + ½ Menge 2 ‰ Dopa	Reagensglas		Z. T.	s ≦ w geringer Ausschlag	gek. >> ungekocht dabei s = w
4	„	gelb +	gelb	—	„	Kieselguhr + 12 ccm Ringerlösg. + 3 ccm Chloroform	idem	„	idem	„	Dopa in Ringerlösung	37°	starke Dunkelung in den oberen Schichten ohne Bodensatz	gek. > ungekocht
5	„	schw. u. weiss	schw. +	9 ½	„	Kieselguhr 30 cc Ringerlösung	1 Stde. stehen, dann centrifugieren, ein Teil d. Saftes gekocht, ein Teil des Saftes 15' lang mit H_2S beschickt ½ Stde lang stehen gelassen, hierauf durch 1 ½ stünd. Einleiten von Luft vom überschüssigen H_2S befreit.		idem	„		37° ohne H_2S	nach 37 Stdn. s > w nach 40 „ s = w	ungek. ≧ gekocht s > w
6	„	schw. u. weiss	schw. +	12	„	Kieselguhr + 25 ccm aq. dest.	kurz durchgeschüttelt u. centrifugiert, teilweise gekocht	klar ?	idem	„	Saft und phys. NaCL. Lösung	37° mit H_2S Z. T.	s >> w s >> w	gek. > ungekocht dabei s = w
7	„	gelb und weiss	gelb +	8	„	CO_2 + 25 ccm 2 ‰ Dopa	centrifugiert, teilweise gekocht	„ ?	idem	„	Dopa	Z. T.	nach 24 Stdn g > w nach 72 Stdn w > g	gek. >> ungekocht s = w
8	„	schw. u. weiss	schw. +	5 ½	„	CO_2 + 15 ccm aq. dest	centrifugiert	„ ?	idem	„	Saft + phys. NaCL. Lösung Dopa allein	4 Std. 37° dann Z. T.	w ≧ s	—
9	„	1 Me. s. 1 Me. w.	schw. + w. —	8 ½	„	Kieselguhr + 20 ccm Ringerlösung	1 Stde Schüttelmaschine 1 Stde centrifugiert	„ —	Saft + ½ Menge 1 ‰ Dopa	Blockschälchen.	idem	Z. T.	w >> s	gekocht > ungekocht dabei w ≧ s
10	Kaninchen	schwarz u. weiss	schw. + —	—	„	CO_2 + Kieselguhr + 1 ccm aq. dest	hydraul. Presse 30 Atmos.	„	idem	„	idem	Z. T.	s = w	—
11	Gleiches Tier wie in Vers. 10	schwarz u. weiss	—	—	„	CO_2 + 5 ccm aq. dest.	hydraul. Presse 80 Atm.	„	Saft + gleich. Menge 1 % Dopa 1 % Tyrosin 1 % Adrenalin	„	Dopa Tyrosin Adrenalin	Z. T. 37°	s = w Ausfall bei 37° stärker als bei Z. T.	Dopa Tuscheschwarze Verfärbung Adren.: leichte rötliche Verfärbung Tyros. leichte Bräunung

Tabelle VI.

Versuch 12.

Braun pigmentierte Haut		Vitiligo Haut	
Brutschrank		*Brutschrank*	
mit Dopa	*mit Tyrosin*	*mit Dopa*	*mit Tyrosin*
nach 16 Std.	nach 16 Std.	nach 16 Std.	nach 16 Std.
Grauschwarze Farbe mit deutlich schwarzen Partikelchen	Gar keine Veränderung ist eingetreten, die Farbe graulichweiss, wie vor dem Einlegen in den Brutschrank	Die Emulsion ist dunkelgrau, mit grauschwarz. Partikelchen; eine Spur dunkler als bei der braun pigmentierten Haut	Keine Veränderung ist eingetreten, Farbe der Emulsion ist wie vor dem Einlegen in den Brutschrank.
b. *Zimmertemperatur*		b. *Zimmertemperatur*	
nach 24 Std.		nach 24 Std.	
Die Emulsion ist dunkelgrau schwarz mit schwarz. Partikelchen; sie ist deutlich dunkler als die weisse Vitiligo-Haut	keine Veränderung hell	Es ist ein deutlicher Unterschied eingetreten, indem hier die Emulsion heller ist, als bei der braunen pigm. Haut, die Farbe ist dunkelgrau, aber nicht schwarz wie bei der andern Haut	Keine Veränderung
nach 48 Std.		nach 48 Std.	
Der Unterschied ist immer vorhanden, indem die Emulsion noch schwärzer geworden ist	Keine Veränderung	Emulsion gräulich, deutlich heller als der andern Emulsion der pigm. Haut	Keine Veränderung
nach 72 Std.		nach 72 Std.	
Die Emulsion unterscheidet sich von der Vitiligo-Haut sehr stark in der Farbe, sie ist braunschwarz undurchsichtig mit herumschwimmenden schwarzen Flöckchen	Die Mischung zeigt eine ganz helle und etwas grau untermischte Farbe (Hafersuppe)	Die Mischung zeigt eine aschgraue Farbe (mit H_2O eingerührt) mit graudunklen Flöckchen	Die Emulsion zeigt einen meistenteils ins gelbliche gehenden Ton, sonst weiss.
nach 96 Std.		nach 96 Std.	
Die Grundfarbe bleibt wie nach 72 Std., die Partikelchen sind kohlenschwarz	wie nach 72 Std.	Die Emulsion wird dunkler aschgrau, die kleinen Partikelchen grau	Wie nach 72 Std.

Tabelle VII.

Versuch 13.

Normale braune Haut		Weisse (Vitiligo) Haut	
b. *Zimmertemperatur*	*im Brutschrank*	b. *Zimmertemperatur*	*im Brutschrank*
nach 18 Std.	nach 2 Std. noch keine Veränderung hell	nach 18 Std.	nach 2 Std. keine Veränderung hell
Es ist ein Unterschied vorhanden im gleichen Sinne wie nach 18 Std. bei Bruttemperatur, aber in geringerem Grade. Emulsion ist dunkler als bei der Vitiligo; der Unterschied ist aber nicht sehr gross	4 Std. grau dunkel	Die Emulsion ist heller wie die der normalen Haut.	4 Std. keine Veränderung hell
	8 Std. leicht gräulich mit schwärzlichen Punkten		8 Std. es wird leicht hellgrau
	15 Std. An der Oberfläche viele schwärzliche Partikelchen bedeutend dunkler als bei der weissen Haut.		15 Std. man sieht graue Partikelchen in der helleren Emulsion
	18 Std. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen normaler Haut und der Vitiligo Haut, die Emulsion ist hier viel dunkler gefärbt als bei der Vitiligo Haut. Hier sind die Partikelchen dunkel grauschwarz bis rein schwarz. Es ist zu bemerken, dass nicht eigentlich die Flüssigkeit dunkel geworden ist, sondern vor allem die Partikelchen der Emulsion		18 Std. Die Partikelchen sind von bleigrauer Farbe
nach 42 Std.		nach 42 Std.	
Der Unterschied bleibt immer vorhanden. Beim Umrühren der Emulsion treten kleine graue Punkte hervor die alle schwarz gefärbt sind.	42 Std. Kein Unterschied. Die Flüssigkeit scheint leicht bräunlich	Beim Umrühren der Flüssigkeit treten hellgraue Emulsions-Partikelchen auf die Oberfläche, die den Unterschied noch deutlicher hervortreten lassen.	
nach 66 Std.		nach 66 Std.	66 Std. grauschwarz
vollständig schwarz.	66 Std. vollständig schwarz	bräunlichschwarz	

Tabelle VIII.

Versuch 15. Emulsion der schwarzen Haut.

	nach 24 Std.	nach 48 Std.	nach 72 Std.	nach 96 Std.	nach 144 Std.
a) *ungekocht.* 2 ccm. Saft +					
1) Dopa	keine Reaktion leicht braun	leicht braun an der Oberfläche	oberfl. Schicht deutlich braun schwarz	an der Oberfläche deutlich braunschwar. Schicht, untengraudunkel wie der vorhergehende, nur weniger dunkel an der Oberfl.	Oberfl. der Emulsion ganz schw., untere Schicht dunkelgrau
2) Dopa + Toluol	etwas dunkel	keine Reaktion	wie d. vorhergehende	wie d. vorhergehende nur weniger dunkel an der Oberfläche	wie d. vorhergehende
b) *gekocht.* 2 ccm. Emuls. +					
1) Dopa	gelatinös etwas dunkel	alles geronnen, an d. Oberfläche deutlich dunkelbraune Färbung	geronnen, Obere Schicht deutlich braunschwarz	geronnen, Oberfl. braunschwarz, Emulsion dunkelgrau	geronnen, Obere Schicht dunkelbraununtengrau
2) Dopa + Toluol	„	„	„	Oberfläche dunkler als d. vorhergehende, sonst gleich	Hälfte d. Emulsion schwarz, untere Hälfte graubraun

Versuch 15. Emulsion der weissen Haut.

a) *ungekocht.* 2 ccm. Emuls. +					
1) Dopa	wie die farbige Haut	hellgrau	hell an der Oberfläche, Stich ins violett	an der Oberfläche Stich ins violette, untere Schicht hellgrau	obere Schicht Stich ins rosarot, hie und da schwarz. Punkte
2) Dopa + Toluol		hellgrau	an der Oberfläche grauviolett	Oberfl. schwärzlich, untere Schicht hellgrau	Oberfl. schwarz, untere Schicht hell
b) *gekocht* 2 ccm. Emuls. +					
1) Dopa		an d. Oberfläche ein wenig dunkel	wie nach 48 Std.	Oberfl. bräunlich, unt. Schicht hellgrau	wie nach 96 Std.
2) Dopa + Toluol		an der Oberfl. leicht dunkler Saum	Oberfl. dunkel grau	Oberfl. dunkelbraunschwarz, untere Schicht grau	Obere Hälfte schwarz, untere Hälfte grau

Tabelle IX.

Versuch 16.

Schwarze Haut		Gelbe Haut		Weisse Haut	
Zimmertemperatur		*Zimmertemperatur*		*Zimmertemperatur*	
it Dopa 1 ccm.	mit NaCl. phy. Lös. 1 cc.	mit Dopa 1 ccm.	mit NaCl. phy. Lös.	mit Dopa 1 ccm.	mit NaCl. phys. Lös.
nach 24 Std.		nach 24 Std.		nach 24 Std.	
auschwarz mit chwarzen Parti-elchen	hellgrau	bläulichgrau heller als die schwarze Haut	weiss	gräulich, heller als gelbe Haut, und schwarze Haut	weiss
nach 48 Std.		nach 48 Std.		nach 48 Std.	
e nach 24 td.	hellgrau	grau bis schwarz, ein wenig dunkler als die schwarze Haut	weiss	dunkelgrau ungefähr so schwarz wie gelbe Haut	weiss
nach 72 Std.		nach 72 Std.		nach 72 Std.	
kein Unterschied		mehr zwischen		schwarzer, gelber und weisser Haut	

Tabelle X.

Versuche mit Hautemulsionen.

№	Haut vom	Dopareakt. im Hautschnitt.	Farbe der Hautstücke.	Gewicht der Hautstücke	Zerkleinerung nach Enthaarung	Zusatz beim Verreiben im Mörser (CO_2 = Kohlensäureschnee	Sedimentierung	Behandlung des Bodensatzes bezw. des Rückstandes	Versuchsanordnung	Gefäss	Controllen	Temperat.	Ausfall der Reaktion (Ausfall > stärker als; s = schwarze bezw. pigment. Haut; g = gelbe Haut; w = weisse bezw. depigmentierte (Vitiligo) Haut)	
12	Mensch (Vitiligo)		depigmentierte und normal pigmentiert	—	Gefriermikrotom	CO_2 + 1ccm dest. Wasser	—	—	(a) Dopa 1 ‰ Em. + (b) Tyrosin 1 ‰	Block-Schälchen		16 St. 39° dann Z. T.	nach 16 Stunden s = w nachher bei z. T. deutlich s > w	Bei Tyrosin Ausfall vollständig negativ
13	do.		id.	—	„	CO_2 + 2 ccm 1 ‰ Dopa	—	—	Emulsion + 2 ccm Dopa	„	Dopa	a) 37° b) Z. T.	s > w Unterschied stärker bei 37°	
14	do.		id.	—	„	CO_2 + 1 ccm dest. Wasser	—	—	a) Dopa 1 ‰ E + b) Adrenal. 2 ‰ c) Tyrosin 1 ‰	„	Adrenalin Tyrosin	Z. T.	s > w nach 72 Std. Unterschied verwischt	Ausfall bei Tyrosin negativ, bei Adrenalin rötl. Verfärb. d. Haut
15	Meerschw.	schwarz +	schwarz und weiss	8 gr.	„	CO_2 + 25 ccm 1 ‰ Dopa	centrifugiert	Emulgierung mit 1 ccm 2 ‰ Dopa, teilweise gekocht	E + ½ Menge 2 ‰ Dopa	Reagens Glas.		Z. T.	s > w deutl. Unterschied	gekocht > ungekocht
16	do.		schwarz, gelb u. weiss	—	„	CO_2 + 1 ccm H_2O	—	—	E + ½ Menge 1 ‰ Dopa	Block-schälchen	phys. NaCl Lsg.	Z. T.	nach 24 Std. s > g > w nach 72 Std. s = g = w	(s = w) ungek. > gek.
17	Meerschwein	bei schwarz +	schwarz und weiss	9 ½ gr.	„	Kieselguhr 30 ccm Ringerlösung	1 Stde. stehen lassen, dann centrifugieren	Emulgierung in 30 ccm Ringerlösg. teilw. gekocht. Teil der Emuls. mit H_2S behandelt wie Hautsaft	2 ccm Emulsion + 1 ccm 2 ‰ Dopa id.	Reagens Glas.	Emuls. + phys. NaCl Lsg.	37°	nach 15 Stunden s > w „ 40 „ s = w nach 15 Stunden w ≧ s	gek. > ungek. gek. > ungek. mit H_2S > ohne H_2S
18	do.	bei schwarz +	id.	12 gr.	„	Kieselguhr + 25 ccm aq. dest.	kurz durchgeschüttelt und centrifugiert	Emulgierung in 15 ccm aq. dest. teilweise gekocht	2 ccm Emulsion + 1 ccm 2 ‰ Dopa	„	Emuls. + phys. NaCl Lösung	Z. T.	s ≧ w geringer Ausschlag	gek. = ungek.
19	do.	bei gelb +	gelb und weiss	8 gr.	„	CO_2 + 25 ccm 2 ‰ Dopalösung	centrifugiert	Emulgierung in 10 ccm 2 ‰ Dopalösung, teilweise gekocht	2 ccm Emulsion + 1 ccm 2 ‰ Dopa	Rg. Glas	Dopa	Z. T.	s ≧ w geringer Ausschlag	gek. >> ungek. viel stärkerer Ausschlag
20	do.	bei schwarz +	schwarz und weiss	5 ½ gr.	„	CO_2 + 15 ccm aq. dest.	centrifugiert	Emulgierung in 10 ccm H_2O	2 ccm Emulsion + 1 ccm 2 ‰ Dopa	Rg. Gl.	Emuls. + Phys. NaCl Lösg.	4 St. 37° dann Z. T.	s ≧ w geringer Ausschlag	—
21	do.	—	id.	8 gr.	„	1. Hälfte: 10 ccm 70 % Alkohol 2. Hälfte: 1 ‰ Dopa	—	—	2 ccm Emuls. + 1 ccm 2 ‰ Dopa	Block-schälchen	Dopa + Alkoh. 70 % Emuls. + phys. NaCl Lg.	Z. T.	mit Alkohol s ≧ w ohne Alkohol s ≧ w geringer Ausschlag	—
22	do.	—	id.	—	„	CO_2 + 1 ccm aq. dest.	—	—	Em. + 1 ccm aq. d. + a) 1 ccm Dopa 1 ‰ b) 1 ccm Tyros. 1 ‰	„	Dopa	16 St. 37° dann Z. T.	schw. ≧ w starke Dunkelung in den Röhrchen	Ausfall mit Tyrosin negativ.
23	do.	—	id.	—	„	id.	—	—	Emuls. + Tyrosin Dopa	Block-schälchen	—		nach 48 St. s > w st. Dunkelung nach 72 St. s = w	Ausfall mit Tyrosin negat.
24	do.	bei grau +	grau und weiss	—	„	id.	—	—	Emuls. + 1 ccm 1 ‰ Dopa	„	Emuls. + phys. Kochs. Lsg.	Z. T.	gr. > w starke Dunkelung	—
25	do.	bei schw. +	1) Me. schw. 2) Me. weiss	8 ½	„	Kieselguhr + 20 ccm Ringerlösung	1 St. lang Schüttelmaschine 1 St. centrifugiert	Emulgierung in 10 ccm Ringerlösung teilweise gekocht	2 ccm Emuls. + 1 ccm Dopa 1 ‰	„	E. + phys. NaCl Lsg. Dopa	Z. T.	s ≧ w schwacher Ausschlag	gek. > ungek.
26	*Kaninchen*	bei dunk. +	dunkel und weiss	—	„	CO_2 + 1 ccm aq. dest.	—	—	Emuls. + 1 ccm Dopa 1 ‰	„	E. + phys. NaCl Lösg.	Z. T.	s >> w starker Ausfall sehr starker Unterschied	
27	do.	„ „ ±	dunkel und weiss	—	„	CO_2 + Kieselguhr + 1 ccm aq. dest.	hydraul. Presse 30 Atm.	in 3 ccm aq. dest. aufgeschwemmt	Emuls. + 1 ccm Dopa 1 ‰ + 1 ccm phys. NaCl Lösung	„	id.	Z. T.	w > s kräftiger Ausfall Unterschied gering	—
28	do.	—	dunkel und weiss	—	„	CO_2 + ½ ccm aq. dest.	—	—	Emuls. + 1 ccm Dopa 1 ‰ + ½ ccm phys. NaCl. Lösung	„	id.	Z. T.	s = w vollständig Schwarzfärbung in beiden Röhrchen	—
29	gleiches Tier wie in Versuch 15	—	dunkel und weiss	grosse Hautstücke	„	CO_2 + 5 ccm aq. dest.	hydraul. Presse 80 Atm.	in 6 ccm aq. dest. aufgeschwemmt	E. + a) 1 ccm Dopa 1 ‰ b) 1 „ Tyros. 1 ‰ c) 1 ccm Adren. 1 ‰	„	Dopa Tyrosin Adrenalin	Z. T. 39°	s w starker Ausfall s = w vollständig Schwarzfärbung	Ausfall mit Tyr. negativ bei Adrenalin, Auftreten eines rötlichen Tones bei der schwarz. Ht.
30	gleiches Tier wie in Ver. 15	—	dunkel und weiss	—	„	CO_2 + 3 ccm aq. dest.	—	—	E. + 1 ccm Dopa 1 ‰ optisch aktiv	„	E. + phys. NaCl Lösung	Z. T.	w > s zieml. starker Ausfall	
31	1 gefl. 1 Albino-Kaninchen	dunkl. Haut React. nur in den bulbis Albino R. —	dunkel weiss und albinotisch	—	„	id.	—	—	E. + (a) Dopa 1 ‰ opt. aktiv; (b) Dop. 1 ‰ racemisch	„	E. + phys. NaCl. Lsg.	Z. T.	w ≧ s > albino	Dopa racemisch ≧ opt. act.
32	Kaninchen	R. ±	vor 14 Tgn. enthaarte w. in d. Folge dunkel pigmentierte Haut	—	„	id.	—	—	id.	„	id.	Z. T.	sehr starker Ausfall, vollständige Schwarzfärbung	Dopa rac. > opt. act.

Literatur.

Bloch Br. Das Problem der Pigmentbildung in der Haut. Arch. f. Dermat. und Syph. 1917.

Bloch Br. & Ryhiner. Histochemische Studien in überlebenden Geweben über fermentative Oxydation und Pigmentbildung. Zeitschrift f. d. ges. experim. Medizin, Bd. 5, 1917.

Durham Fl. On the presence of Tyrosinases in the skin of some pigmented Vertebrates. Proc. of the royal Soc. 1904 *74,* 310.

v. Fürth & Schneider. Über tierische Tyrosinasen und ihre Beziehungen zur Pigmentbildung. Beitr. z. chem. Phys. und Path. 1902, *1,* 229.

Gessard. Sur la formation du pigment mélanique dans les tumeurs du cheval. C. R. Acad. des sciences 1903, *136,* 1086.

Ders. Tyrosinase animale. C. R. Soc. de Biol. 1902, *54,* 1304.

Unna. Biochemie der Haut. Jena 1913.

Weindl. Pigmententstehung auf Grund vorgebildeter Tyrosinasen. Arch. f. Entwicklungsmech. 1907, *23,* 632.

Druckfehler.

Seite 6, 25. Zeile, lese: **existierte** statt existiert.
„ 6, 27. „ „ **oxydierte** „ oxydiert.
„ 6, 27. „ „ **könne** „ kann.
„ 6, 31. „ „ **handelte** „ handelt.
„ 11, 2. „ „ **Prozess des Kochens nicht fermentative Substanzen,** statt Prozess des Kochens Substanzen, etc.
Seite 15, 4. Zeile, lese: **vitiliginösen** statt viliginösen.